

機関番号：72101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20570146

研究課題名(和文)  $V\alpha 19$  NKT 細胞の免疫系調節因子分泌能と自己免疫病の抑制研究課題名(英文) Immunoregulatory cytokine production and suppression of autoimmune diseases by  $V\alpha 19$  NKT cells

研究代表者 島村 道夫 (SHIMAMURA MICHIO)

財団法人国際科学振興財団・研究開発部・専任研究員

研究者番号：70399682

研究成果の概要(和文)：

$V\alpha 19$ NKT 細胞は TCR への刺激の種類により免疫応答を変化させ、この能力に基づいて免疫系を制御し、自己免疫病やアレルギー疾患を抑制する可能性を示した。実際疾病モデルマウスにおいて invariant TCR トランスジーンを導入により  $V\alpha 19$ NKT 細胞を過剰発生させることで病状の進行が抑制されること、加えて  $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化作用を持つ  $\alpha$ -ManCer4Ph の投与により抑制効果が増強されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：

We have shown that  $V\alpha 19$  NKT cells possess potential to differently response to the stimulation to TCR depending on the intensity and the duration of TCR engagement. In fact disease progress in the models for autoimmunity or allergy was suppressed by the introduction of the invariant  $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$  TCR transgene. Furthermore, the suppression was enhanced by the administration of  $V\alpha 19$  NKT cell activator  $\alpha$ -ManCer4Ph.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：免疫生化学

## 1. 研究開始当初の背景

$V\alpha 19$ -J $\alpha 26$  (AV19-AJ33) 間で遺伝子再構成した invariant な T 細胞レセプター ( $V\alpha 19$  TCR) は当初末梢血細胞での発現が PCR 法により示されていた。これは肝臓、腸管、骨髄、脾臓、リンパ節などの免疫系組織に主として第2の NKT

細胞として発現していることを示した (Shimamura & Huang, FEBS Lett., 516: 97 (2002))。  $V\alpha 19$  TCR  $\alpha$  鎖遺伝子のトランスジェニック (Tg) マウスでは TCR 発現に依存して  $V\alpha 19$  NKT 細胞が過剰発生し、正常マウスでも肝臓では単核球の1%の存在数が推測さ

れ、T リンパ球クローンとして主要な存在である。Tg マウスから調製したV $\alpha$ 19 NKT 細胞についての詳細な解析からこの細胞はTCR への刺激に応答してIL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17 などのサイトカインを分泌し、V $\alpha$ 14NKT 細胞同様に免疫系調節機能をもつことが予測された。V $\alpha$ 19 NKT 細胞はMHCクラスI様分子MR1 拘束性であることが報告された。MR1 に提示される抗原は、Tap 非依存的にプロセスされエンドゾームを經由してこれにロードされること、およびMR1 抗原提示部位の一次構造の考察から、非ペプチド性の物質であることが強く示唆された。実際私達はV $\alpha$ 19 NKT 細胞はMR1 に提示された非還元末端に $\alpha$ -mannosyl (Man) 残基をもつ糖脂質のいくつかに特異的に免疫応答することを明らかにした。一方多発性硬化症の患部にV $\alpha$ 19TCR 陽性細胞の集積が観察され、しかも動物モデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)がV $\alpha$ 19NKT 細胞により抑制されることが判明した(Croxford et al. Nat. Immunol. 7:987(2006))。これらの事実からV $\alpha$ 19 NKT 細胞はV $\alpha$ 14 NKT 細胞とは異なる独自の機序により免疫系を上流から制御する担い手として重要な研究対象と考えられる。そこでV $\alpha$ 19NKT 細胞は抗原認識に応じて免疫応答をどのように変化させ得るかを調べ、免疫系調節にいかにか寄与するか検討する必要がある。またこの細胞の機能を制御可能な物質は免疫系疾患の治療薬としての可能性をもつ。特異的活性化剤としてスクリーニングされた $\alpha$ -Man 化糖脂質の自己免疫病、アレルギー病モデルマウスに対する投与効果を検討し、治療薬としての可能性を明確にすることが重要である。

## 2. 研究の目的

V $\alpha$ 19 NKT 細胞の免疫系調節機構を明らかにするためにこの細胞の抗原刺激に応答した調節因子分泌能の特徴を明確にする。V $\alpha$ 19 NKT 細胞の特異的活性化剤としてスクリーニングされた $\alpha$ -Man 化糖脂質投与による病状抑制効果をモデル動物において確かめ、この細胞の機能を生かした免疫系疾患の治療法の基礎を築くことを目的とする。

### (1) 免疫系調節因子発現の特徴

V $\alpha$ 19NKT 細胞をTCR やNK レセプターを介して強弱をつけて刺激を加え、それぞれに応じた免疫系調節因子発現を明確にする。これにより免疫系ホメオスタシスへの寄与の分子的基盤を明らかにする。

### (2) $\alpha$ -Man 化糖脂質によるV $\alpha$ 19NKT 細胞の特

### 異的活性化

生物体からの精製あるいは化学合成により得た種々の $\alpha$ -Man 化糖脂質によるV $\alpha$ 19NKT 細胞の活性化を検討し、最適の活性化剤を決定する。

### (3) 自己免疫、アレルギー病制御機能

多発性硬化症モデルEAEの系に加え、種々の自己免疫、アレルギー病モデルマウスにおけるV $\alpha$ 19NKT 細胞の機能、 $\alpha$ -Man 化糖脂質投与による病状抑制効果を明確にする。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫系調節因子発現の特徴

V $\alpha$ 19NKT 細胞の機能的特徴を明確にするため、抗原刺激に応答した免疫系調節因子の分泌能を検索する。invariant V $\alpha$ 19 TCR Tg<sup>+</sup> TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス肝臓単核球細胞(TCR としてinvariant V $\alpha$ 19 Tgのみが使用され、NKT 細胞が30%を占める)を材料にしてV $\alpha$ 19NKT 細胞を精製し、培養中で活性化させたときのサイトカインの発現を対照のC57BL/6 マウス、 $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>マウスT細胞と比較する。このとき異なる濃度の固相化抗CD3抗体, 抗NK1.1抗体で刺激したときの応答を調べ、活性化の仕方に応じた免疫応答の変化を明らかにする。

### (2) $\alpha$ -Man 化糖脂質によるV $\alpha$ 19NKT 細胞の特異的活性化

V $\alpha$ 19NKT細胞活性化物質として $\alpha$ -Man化糖脂質のいくつかを見出したが、活性物質の最適化には検討の余地があり、また自然抗原の決定はなされていない。Birmingham大学 Dundee大学 東海大学等から $\alpha$ -Man化コレステロールなど天然由来および合成 $\alpha$ -Man化糖脂質を入手した。これらの刺激によるV $\alpha$ 19NKT細胞の活性化の有無を検討する。invariant V $\alpha$ 19 TCR Tg<sup>+</sup> TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス肝臓単核球細胞の培養中に候補となる糖脂質を加えて刺激を与えたときの上清へのサイトカインの分泌をELISA法で決定し、対照の $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>マウスT細胞の応答と比較する。また抗MR1抗体(クローン26.5, Washington大学 T. Hansen博士より供与された)添加の効果を調べ、MR1依存性を確認する。

### (3) 自己免疫、アレルギー疾患モデルにおけるV $\alpha$ 19NKT 細胞の病状制御機能

V $\alpha$ 19NKT細胞の自己免疫制御機能を明らかにするため自己免疫およびアレルギー病におけるV $\alpha$ 19NKT細胞の関与をV $\alpha$ 19 TCRTg導入および非導入疾病モデルマウスの病状

進行を比較する。自己免疫性糖尿病モデル NOD マウスについては V $\alpha$ 19 invariant TCR Tg を導入したラインを 3 種樹立した。V $\alpha$ 19NKT 細胞を過剰発生させることにより、糖尿病の自然発症を抑制あるいは推進するか血糖値のモニターにより調べる。Th1 過剰で増悪する IV 型アレルギーモデルとしてヒツジ赤血球投与で感作したマウスに同抗原により足蹠に誘導した遅延型過敏症を足厚の変化として測定する。Th2 過剰で増悪する I 型アレルギーを卵白アルブミン(OVA)あるいはヤギ抗マウス IgD 抗血清投与で誘導し、免疫グロブリン各アイソタイプの血清レベルを V $\alpha$ 19 TCR Tg 導入および非導入マウスにおいて測定する。

また、 $\alpha$ -Man 化糖脂質の疾病モデルマウスへの投与の効果を検討し、これらの物質の医薬品としての可能性を明確にする。

#### 4. 研究成果

##### (1) V $\alpha$ 19NKT 細胞の刺激の種類に応じたサイトカイン分泌能の特徴

V $\alpha$ 19NKT 細胞のサイトカイン分泌は TCR への刺激の強度および持続時間に依存することが強く示唆された。相対的に微弱な刺激を受けることにより IL-4, IL-5, IL-10 等の Th2 推進性のサイトカインの分泌が、比較的強い刺激により IFN- $\gamma$  や IL-17 の分泌が優先することが明らかになった。また IL-4 の分泌は刺激の開始から即時的に起こるのに対し、IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 では分泌のピークがこれに遅れることが観察された。以上の結果は V $\alpha$ 19NKT 細胞の応答が抗原や提示細胞の種類などに依存して変化し、結果として免疫反応が制御されうる可能性を示唆する。

一方 V $\alpha$ 19 NKT 細胞が発現する NK 細胞受容体のひとつ NK1.1 (NKR-P1) に対し抗体による擬似刺激を与えると TCR に対する刺激と比較して微弱な応答が得られたが (サイトカインの種類により 1/30~1/100)、これは V $\alpha$ 14 NKT 細胞が 1/15~1/30 だったのに比べてさらに小さく、また V $\alpha$ 14 NKT 細胞で観察される NK1.1 刺激における IFN- $\gamma$  分泌の IL-4, IL-13 分泌に対する優先性が V $\alpha$ 19NKT 細胞では見られなかった。

V $\alpha$ 19NKT 細胞は TCR への刺激に応答して IL-17 を自身でも産生するが、V $\alpha$ 19NKT 細胞活性化を引き金として共存する T 細胞にこれの産生誘導をすることが細胞内染色実験から推察された。

##### (2) $\alpha$ -Man 化糖脂質による V $\alpha$ 19NKT 細胞の特異

的活性化

微生物由来及び化学合成された種々の  $\alpha$ -Man 化糖脂質の V $\alpha$ 19NKT 細胞に対する刺激能を検討した。その結果この細胞を活性化する物質として新たに 3-(6-myristyl  $\alpha$ -Man) cholesterol (ChAcMan, *Candida albicans* に存在が示唆されている。また同様の構造の glucoside は *Helicobacter pylori* に存在する) および放線菌の一種 *Saccharopolyspora* 由来のグリセロ糖脂質 3-( $\alpha$ -Man1-3- $\alpha$ -Man) 1-monoacylglycerol、ここで還元末端  $\alpha$ -Man 基 6 位は acyl 化されている) を見出した。これらはいずれも  $\alpha$ -Man 基をもつ糖脂質で、以前見出した活性物質  $\alpha$ -ManCer 誘導体 (スフィンゴシン骨格 C4 位に Ph 基を導入した化合物  $\alpha$ -ManCer4Ph) と同様の基本構造を有し、V $\alpha$ 19NKT 細胞に対して IL-4 および IFN- $\gamma$  の分泌を誘導した。6 位 acyl 基をはずすと活性を失った。これらの化合物は MR1 遺伝子導入細胞に取り込ませることにより V $\alpha$ 19NKT 細胞を活性化すること、および anti-MR1 ブロッキングモノクローナル抗体により活性化能が部分的に抑制されたことから、その MR1 拘束性が確認された。

##### (3) 疾病モデルマウスにおける V $\alpha$ 19NKT 細胞の機能と $\alpha$ -Man 化糖脂質投与の効果

V $\alpha$ 19 TCR Tg の導入が疾病モデルマウスにおける病状進行に与える効果を検討した。臓器特異的自己免疫性 I 型糖尿病モデル (NOD マウス) では独立に作成した Tg 導入マウスラインに共通して血糖値上昇の抑制が観察され、糖尿病発症が抑えられた (図 1)。IV 型アレルギー遅延型過敏症 (DTH) 病態モデルにおいても Tg マウスでは野生型マウスと比較して病態抑制効果が認められた (図 2)。このとき血清 IFN- $\gamma$  および IL-17 レベルは Tg マウスでは Tg<sup>-</sup>マウスと比較して有意に低かった。一方 I 型アレルギー誘導抗原投与後の血清 IgE, IgG1 レベルを測定すると V $\alpha$ 19 TCR Tg マウスにおいて野生型マウスよりも上昇が抑制されていた。実験に供したマウスの脾臓細胞を培養に移し上清への IFN- $\gamma$  および IL-17 分泌を測定すると、Tg マウスでは Tg<sup>-</sup>と比較して大きくなっていった。後者 2 つの疾病モデルモデルのいずれにおいても野生型マウスに予め Tg マウスから調製した V $\alpha$ 19NKT 細胞を養子移入したときも Tg マウス同様に病状の進行が抑制された (図 3)。加えてこれら 2 つの疾病モデルにおける  $\alpha$ -Man

化糖脂質投与の効果を検討したところ、両モデルにおいて V $\alpha$ 19Tg マウス、あるいは Tg<sup>-</sup>マウスに Tg<sup>+</sup>細胞を養子移入したマウスでは病状進行の抑制は  $\alpha$ -ManCer4Ph の投与により強まることが分かった。このとき野生型マウスに対する効果は小さかった (図 2、3)。活性化剤 ChAcMan の投与は相対的に V $\alpha$ 19NKT 細胞よりも V $\alpha$ 14NKT 細胞の強い活性化を誘導し、CD1 依存的に DTH およびアレルゲン投与後の血清 IgE、IgG1 レベル上昇の両方を抑制することが示唆された。

以上の結果から V $\alpha$ 19NKT 細胞は Th1/Th2/Th17 免疫系のバランスのホメオスタシスに寄与し、免疫系疾患の抑制に機能すること、また活性化剤の作用によりその抑制効果が増強されることが示唆された。

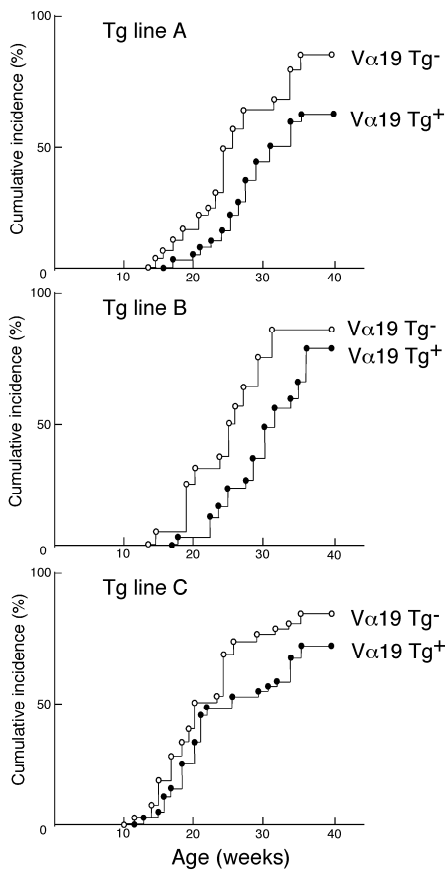


図 1 NOD マウスへの V $\alpha$ 19 TCR Tg 導入による糖尿病(血糖値 >200mg/dl)発症の抑制

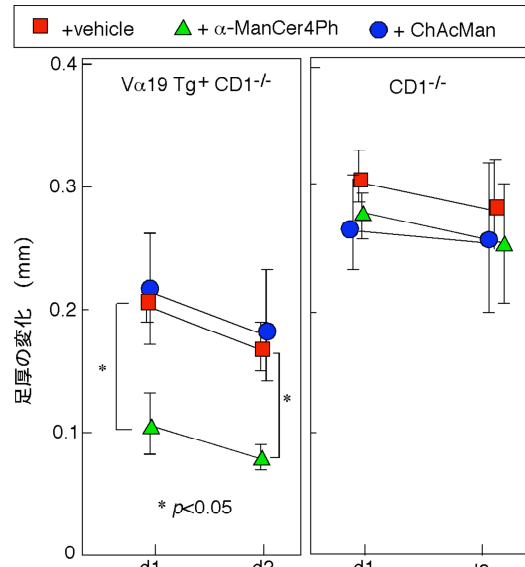


図 2 遅延型過敏症に与える  $\alpha$ -Man 糖脂質投与の影響。ヒツジ赤血球を投与の1週間後に同抗原を足蹠に投与、同時に  $\alpha$ -Man 糖脂質を投与し、足厚を測定した。

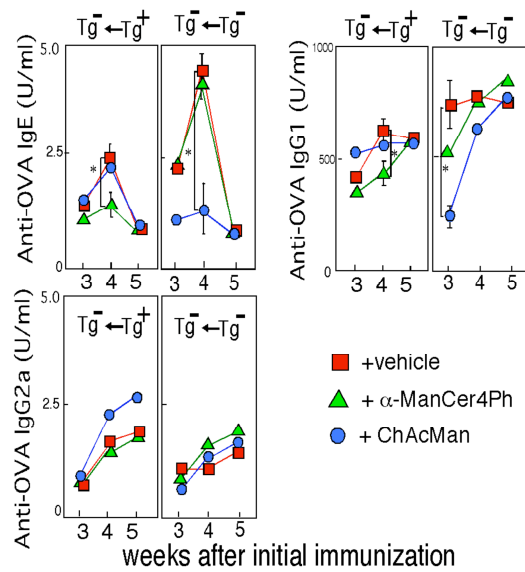


図 3 OVA 免疫時 (0、2 週目) に  $\alpha$ -Man 糖脂質を投与したときの血清抗 OVA 抗体レベルに与える影響。V $\alpha$ 19 TCR Tg または Tg<sup>-</sup>マウス細胞を養子移入した B6 マウスについて分析した。\* $p$ <0.05。

#### 考察と今後の展望

V $\alpha$ 19NKT 細胞は Th1 過剰あるいは Th2 過剰で増悪する自己免疫病やアレルギー疾患のいずれをも抑制し、加えて V $\alpha$ 19NKT 細胞の活性化作用を持つ  $\alpha$ -ManCer4Ph の投与によりこの抑制効果は増強された。このような V $\alpha$ 19NKT 細胞の機能は本研究において

初めて示されたものである。V $\alpha$ 19NKT 細胞の機能の二面性はこの細胞が有する invariant TCR への刺激の種類に適応して免疫応答を変化させる能力に起因することを示すより具体的な証拠を得ることが今後必要である。本研究では V $\alpha$ 19NKT 細胞の invariant TCR に対する刺激は抗 TCR 抗体を使った擬似刺激により行ない、刺激の強度や時間の制御を可能とした。しかし生体内の免疫反応により近い条件下で V $\alpha$ 19NKT 細胞が二面的な機能を発揮する仕組みを明らかにするため、抗原や提示細胞の種類を変化させて刺激を加えたときに異なる応答が得られることを証明していきたい。

V $\alpha$ 19 TCR 発現細胞の感染症防御への寄与が最近報告され、 $\alpha$ -ManCer4Ph などの感染症防御効果を検討することは興味深い試みであると考えられる。本研究で見出された新しい活性化剤 ChAcMan は  $\alpha$ -マンノシドにもかわらず V $\alpha$ 19NKT 細胞のみならず V $\alpha$ 14NKT 細胞の活性化をもたらした。加えて  $\beta$ 2m 欠損細胞に対する作用が観察され、自然免疫系抗原受容体 Mincle を介した免疫応答を誘導することが九州大学山崎晶教授との共同研究により分かった。したがって V $\alpha$ 19NKT 細胞に対する特異性には問題があった。

V $\alpha$ 19NKT 細胞が TCR への刺激に応答して分泌する因子の中から Th17 細胞分化誘導因子を検索する試み、この細胞が分泌するケモカインの詳しい解析は今後の課題として残った。

今後 V $\alpha$ 19NKT 細胞の自然抗原の検索、 $\alpha$ -ManCer4Ph よりもさらに活性化能の大きい抗原の検索を継続し、また  $\alpha$ -Man 糖脂質投与の効果を本研究で検討したアレルギー病モデルに加え自己免疫病モデルにも検討の範囲を広げる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Michio Shimamura, Yi-Ying Huang and Hiroshi Hidaka  
Modulation of immunoglobulin production by invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 TCR-bearing cells.  
*PLoS ONE*, (in press)
2. Ya-Jen Chang, Hye Young Kim, Lee A. Albacker, Hyun Hee Lee, Nicole Baumgarth, Shizuo Akira,

Paul B. Savage, Shin Endo, Takashi Yamamura, Janneke Maaskant, Naoki Kitano, Abel Singh, Apoorva Bhatt, Gurdyal S. Besra, Peter van den Elzen, Ben Appelmek, Richard W. Franck, Gwangwu Chen, Rosemarie H. DeKruyff,

Michio Shimamura\*, Petr Illarionov\* and Dale T. Umetsu\*

(\*These corresponding authors contributed equally to the completion of these studies.)

Influenza A infection in suckling mice expands a population of NKT cells that protects mice as adults from airway hyperreactivity.

*J. Clin. Invest.* **121**: 57-69 (2011)

3. Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Hiroshi Goji, Shin Endo, Rika Migishima and Minesuke Yokoyama

Regulation of immunological disorders by invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 TCR-bearing cells.

*Immunobiol.*, **216**: 374-378 (2011)

4. Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Masumi Kobayashi and Hiroshi Goji

Altered production of immunoregulatory cytokines by invariant V $\alpha$ 19 TCR-bearing cells dependent on the duration and intensity of TCR engagement.

*Int. Immunol.* **29**: 179-185 (2009)

5. Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Rika Migishima, Minesuke Yokoyama, Takako Saitoh and Takashi Yamamura

Localization of NK1.1<sup>+</sup> invariant V $\alpha$ 19 TCR<sup>+</sup> cells in the liver with potential to promptly respond to TCR stimulation.

*Immunol. Lett.* **121**: 38-44 (2008)

6. Michio Shimamura,

Non-reducing end  $\alpha$ -mannosylated glycolipids that have potential to activate invariant V $\alpha$ 19 NKT cells.

*Carbohydr. Res.*, **343**: 2010-2017 (2008)

7. Michio Shimamura,

Glycolipid stimulators for NKT cells bearing invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 TCR  $\alpha$  chain.

*Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **8**:285-289 (2008)

8. 島村道夫

Invariant V $\alpha$ 19 TCR 発現細胞のサイトカイン分泌能と免疫系制御

臨床免疫・アレルギー科、**49**: 371-376

(2008)

[学会発表] (計 6 件)

1. Michio Shimamura, Peter van den Elzen, and Petr A. Illarionov  
Microbial  $\alpha$ -mannosyl glycolipids capable of inducing cross-priming of both invariant  $V\alpha 14$  and  $V\alpha 19$  TCR-bearing cells. 25th International Carbohydrate Symposium.  
2010年8月1-6日幕張メッセ
2. 岩渕和也、佐藤雅、小倉尚子、小野江和則、Susan Gilfillan、Luc Van Kaer、島村道夫、三宅幸子、山村隆  
生活習慣病マウスモデルにおける CD1d 拘束性と MR1 拘束性 NKT 細胞の異なる機能発現  
第 20 回 Kyoto T cell Conference 2010 年 6 月 4-5 日京大芝蘭会館
3. 島村道夫、遠藤伸、黄怡瑩、Petr Illarionov  
ピロリ菌の産生するコレステリルグルコシドとその誘導体による NKT 細胞の活性化  
日本糖質学会年会 2009 年 9 月 11 日 高山
4. Michio Shimamura, Petr Illarionov, Shin Endo, Yi-Ying Huang, Abel Singh, Apoorva Bhatt, Gurdayl S. Besra, Janneke Maaskant, Ben J. Appelmelk, Hye Young Kim, Muriel Pichavant, and Dale T. Umetsu  
Specific activation of murine and human NKT cells with cholesteryl glycosides produced by *Helicobacter pylori*  
5<sup>th</sup> International Symposium on CD1/NKT cells  
2009 年 3 月 24 日 鎌倉
5. 島村道夫、遠藤伸、Petr Illarionov,  
日本分子生物学会日本生化学会合同年会  
2008 年 12 月 2 日神戸

[図書] (計 1 件)

1. *Glycobiology Research Trends*  
Michio Shimamura (単著)  
Activation of invariant  $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$  TCR  $\alpha$ -bearing cells by stimulation with certain  $\alpha$ -mannosylated glycolipids. pp 199-209  
Nova Science Publishers, New York, Editors: George Powell and Olivier McCabe, (2009)

[その他]

雑誌論文 2 の成果は 2010 年 12 月 14 日付け毎日新聞、日経新聞等主要各紙にその紹介記事が掲載された。また Medical tribune 誌、筑波大学新聞紙上では研究成果に基づく啓蒙

記事が紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 道夫 (SHIMAMURA MICHIO)

財団法人国際科学振興財団・研究開発部・専任研究員

研究者番号: 70399682

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: